

На правах рукописи



Афордоаны Дэниель Мавуена

АДАПТАЦИЯ ШТАММА *FUSARIUM OXYSPORUM* F.SP. *RADICIS-CUCUMERINUM* V03-2G К НОВОМУ РАСТЕНИЮ-ХОЗЯИНУ

03.02.03 – Микробиология

Автореферат

диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2019

Работа выполнена на кафедре биохимии, биотехнологии и фармакологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет».

Научный руководитель: Валидов Шамиль Завдотович, Ph.D.

Официальные оппоненты: Дегтярева Ирина Александровна – доктор биологических наук, главный научный сотрудник отдела агроэкологии и микробиологии Татарского НИИАХП – обособленного структурного подразделения ФИЦ КазНЦ РАН, (г. Казань).

Мухаммадиев Ришат Салаватович – кандидат биологических наук, научный сотрудник Сектора тканевых технологий и производства препаратов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (г. Казань).

Ведущая организация: Федеральное Государственное Бюджетное Научное Учреждение «Всероссийский Научно-Исследовательский Институт Фитопатологии» (Московская область Одинцовский район, р.п. Большие Вяземы).

Защита диссертации состоится 26 декабря 2019 г. в 14:00 на заседании диссертационного совета КФУ.03.07 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, аудитория № 019В.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: г. Казань, ул. Кремлевская 35

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» <http://www.kpfu.ru>

Автореферат разослан «___» 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук



О.А. Кравцова

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Представители вида *Fusarium oxysporum* являются мицелиальными аскомицетами (*Sordariomycetes*; *Hypocreales*; *Nectriaceae*), которые могут быть выделены практически из любого вида почв по всему миру, где они ведут сапрофитный образ жизни, минерализуя органические остатки. Часто представители *Fusarium oxysporum* (*Fox*) являются возбудителями заболеваний растений (Rep, 2009; Mazzeo *et al.*, 2014), снижая урожайности сельскохозяйственных культур и ухудшая качества продукции за счет выделения токсинов опасных для животных и человека (Kokkonen *et al.*, 2010). Отдельные метаболиты *Fox* могут быть токсичны для растений (Bani *et al.*, 2014).

Относительно недавно деление *Fox* на патогенные и непатогенные штаммы получило научное обоснование. У фитопатогенных штаммов были обнаружены дополнительные хромосомы патогенности, которые несут в себе гены, вовлеченные в патогенез, и значительное число транспозонов (Kashiwa *et al.*, 2016). Перенос этих дополнительных хромосом патогенности превращает непатогенные штаммы в фитопатогены (Ma *et al.*, 2013). Очевидно, наличие этих дополнительных хромосом и можно назвать маркером патогенности у *Fox*.

Фитопатогенные штаммы *Fox* делят на специальные формы (*forma specialis*) в зависимости от растения-хозяина и симптомов заболевания: корневые гнили или поражение сосудов. В настоящее время имеются сообщения о 150 специальных формах (Michielse и Rep, 2009; Fourie *et al.*, 2011), которые паразитируют на более чем 120 видах сельскохозяйственных и декоративных растений. Наличие большого количества специальных форм может свидетельствовать о быстрой адаптации фитопатогенных штаммов *Fox* к новым хозяевам. Поскольку половой процесс, который является причиной изменчивости у многих высших организмов, для этого вида не был описан ни в природных, ни в лабораторных условиях (Ma *et al.*, 2013), изменчивость у *Fox* может быть обусловлена мобильными элементами (Davière *et al.*, 2001).

Заражение растений неспецифичным фитопатогенным штаммом *Fox*, не приводит к развитию заболевания, хотя фитопатогенный штамм в этом случае также колонизирует поверхность корня, и даже колонизует корень эндофитно (Bolwerk *et al.*, 2005, Validov *et al.*, 2011). До настоящего времени не удавалось наблюдать изменения специфичности у фитопатогенных штаммов *Fox*, хотя наличие большого количества специальных форм может свидетельствовать о быстрой адаптации фитопатогенных штаммов *Fox* к новым хозяевам.

В настоящей работе мы использовали фитопатогенный штамм *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* (*Forc*) V03-2g, который вызывает корневую гниль у растений огурца. В предыдущих работах было показано, что инокуляция этим штаммом не приводит к развитию корневой гнили на растениях томата (Validov *et al.*, 2011). Мы использовали данный штамм для демонстрации изменения специфичности фитопатогенных *Fox* к растению хозяину.

Изложенное выше обосновывает актуальность исследования, **целью** которого была характеристика свойств, способствующих адаптации штамма *Fusarium oxysporum* f.sp *radicis-cucumerinum* V03-2g к новому растению-хозяину.

Для достижения цели решали следующие **задачи**:

1. Выделить клоны из гетерогенной популяции *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cicutae* V03-2g после заражения томатов и сравнить способность полученных клонов подавлять прорастание семян и заражать растения томата.
2. Выявить наиболее агрессивные клоны штамма *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cicutae* V03-2g и произвести количественное определение их размножения в тканях томата и огурца.
3. Определить уровни содержания транспозонов второго класса в клонах *Forc* V03-2g с измененной специфичностью к растению-хозяину.
4. Охарактеризовать ответ томатов на заражение клонами *Forc* V03-2g по экспрессии генов, ассоциированных с патогенезом.

Научная новизна работы

Впервые показано изменение специфичности к растению-хозяину у фитопатогенных штаммов *Fusarium oxysporum* (*Fox*). В модельном эксперименте производные штамма *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cicutae* (*Forc*) V03-2g, вызывающего корневую гниль огурца (*Cucumis sativus* L.), адаптировались к паразитированию на томате (*Solanum lycopersicum* L.), сохранив патогенность к исходному растению-хозяину. При этом производные штамма *Forc* V03-2g – штаммы SB1, SB2 и SB3 при инокуляции томата повышали в растении уровень экспрессии генов, связанных с патогенезом (PR-гены). Это свидетельствует о том, что растения томатов воспринимают воздействие штаммов SB1, SB2 и SB3 как атаку некротизирующих патогенов.

Научной новизной характеризуются данные, демонстрирующие изменения в содержании транспозонов в геноме штамма *Forc* V03-2g и его производных, а именно возможность быстрых изменений копийности транспозонов, что отражает пластичность геномов *Fox*. Показано, что при культивировании штамма *Forc* V03-2g в лабораторных условиях, повышается количество транспозонов II класса. Кроме того, в производных SB1, SB2 и SB3 штамма *Forc* V03-2g, полученных в результате трехнедельного эксперимента, наблюдаются разнонаправленные изменения количества транспозонов. Такие изменения, с одной стороны, могут быть причиной вырождения штаммов в лабораторных условиях, а, с другой, – приводить к адаптации этих фитопатогенов к новым растениям-хозяевам.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в демонстрации адаптации фитопатогенного штамма *Fusarium oxysporum* к новому растению-хозяину, что является основой для изучения механизмов, способствующих появлению новых специальных форм фитопатогенов, и выявления локусов в геномах этих фитопатогенных грибов, ответственных за специфичность к растению-хозяину. Резкие изменения в количестве транспозибельных элементов иллюстрируют пластичность геномов *Fusarium oxysporum*, которая, вероятно, обеспечивает быструю адаптацию штаммов этого вида к изменяющимся условиям окружающей среды, в том числе и к новым растениям-хозяевам.

Практическое значение полученных данных заключается в выявлении в геноме томатов генов SAAP1, PR10, Chi3 и GEBGA, которые могут быть использованы для определения колонизации некротизирующими фитопатогенами.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Изменение специфичности у фитопатогенных штаммов *Fusarium oxysporum* приводит к расширению круга хозяев.
2. Пластиность генома *Fusarium oxysporum* связана с транспозонами II класса, которые являются маркерами изменений генома.

Связь работы с базовыми научными программами

Работа выполнялась в рамках договора о сотрудничестве между следующими организациями: Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Татарстан, Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский государственный аграрный университет» и акционерного общества с ограниченной ответственностью «Органик парк».

Часть результатов по теме диссертации получены в ходе выполнения проекта «Разработка современных биологических систем защиты растений от биотических, абиотических и антропогенных стрессов, а также технологий их применения в адаптивном земледелии» в рамках ФЦП «Исследование и разработка по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2014-2020 годы» номер соглашения 14.610.21.0017, уникальный идентификационный номер проекта – RFMEFI61017X0017.

Апробация работы

Материалы диссертации представлены на международных и всероссийских конгрессах и конференциях: Международный молодёжный научный форум, Ломоносов (Москва, 2017 г.); конференция INTERACTION: FROM CELL TO HUMAN, Russian-German Seminar dedicated to 30th anniversary of partnership between Justus Liebig University Giessen and Kazan (Volga Region) Federal University Kazan, May 20-24, 2019.

Публикация результатов исследования

По материалам диссертации опубликовано 5 печатных работ, в том числе 3 статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК, а также индексируемых в базе данных Scopus и Web of Science, и 2 тезиса доклада на Международных и Всероссийских конференциях и конгрессах.

Место выполнения работы и личный вклад диссертанта

Основные экспериментальные данные получены непосредственно автором исследования за время работы в Институте фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета (2014-2018 годы). Диссидентом проведен анализ данных отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации. Автор принимал участие в планировании, осуществил экспериментальную и аналитическую часть работы. Все этапы молекулярно-генетического исследования автором выполнены лично.

Диссидентом проведен анализ полученных результатов, которые были обсуждены на семинарах кафедры и лаборатории, после чего были сформулированы выводы.

Структура и объем диссертационной работы

Материалы диссертационной работы изложены на 120 страницах машинописного текста. Работа содержит 18 рисунков и 8 таблиц. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. Библиография включает 210 источников, среди которых 4 отечественных и 206 зарубежных источников.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Коллекция штаммов, использованных в работе и условия культивирования

Штаммы, использованные в работе, приведены в Таблице 1. Штаммы бактерий и микромицетов хранили замороженными в 30% глицерине при -80°C. При необходимости штаммы культивировали на агаризованной среде Чапека (Difco, США) при 28°C с добавлением цефтриаксона (ОАО «Синтез», г Курган, Российская Федерация) в концентрации 100 мкг/мл для предотвращения бактериального загрязнения.

Получение спор микромицетов

Для получения спор в 1 л колбе Эrlenmeyера 500 мл среды Чапека с добавлением цефтриаксона инокулировали штаммы микромицетов в виде 5 -7 кусочков агара (0.5×0.5 см) с содержащимся в них мицелием. Культуры выращивали при 28°C 72 часа при перемешивании (110 об/мин). Споры отделяли от мицелия и кусочков агара фильтруя культуру через стерильную органзу. Концентрацию микроспор определяли с использованием гемоцитометра и световой микроскопии. Фильтрат доводили до концентрации 10^5 спор/мл стерильным ППР.

Для получения биомассы грибы выращивали семь дней при 28°C на жидкой среде Чапека с аэрацией, которую обеспечивало качание при 110 об/мин.

Стерилизация семян и инокуляция

Во всех опытах использовали семена томатов сорта Carmello и огурцов сорта Cymbal, предоставленные компанией Syngenta (Нидерланды), и семена пшеницы *Triticum aestivum L.* сорта Любава (Ассоциация "Элитные семена Татарстана", Российская Федерация). Стерильные семена, полученные в соответствии с методом (Simons *et al.*, 1996), помещали в суспензию микроспор штаммов *Fox* и инкубировали 10 минут при комнатной температуре перед посевом в стерильный песок, смоченный Питательным раствором для растений (ППР; Hoffland *et al.*, 1989). Томатные или огуречные растения выращивали 14 дней при 23°C, влажности 70%, с длиной светового дня 16 ч. Растения пшеницы выращивали при 18°C 14 дней с теми же параметрами влажности и светового дня.

Анализ фитотоксических свойств микроскопических грибов

В работе использовались штаммы фитопатогенных грибов, выделенные с зерен пшеницы *Triticum aestivum L.* (таблица 1). В качестве несовместимых патогенов использовали штаммы *Fusarium oxysporum f. sp. radices-lycopersici* ZUM2407 (Forl ZUM2407) и Forc V02-3g, которые являются возбудителями корневой гнили томата и огурца, соответственно (Validov *et al.*, 2011).

Фитотоксичность, выделенных изолятов, оценивали по действию семи-суточной культуральной жидкости микромицетов на ростовые параметры зерна тест-растения пшеницы *Triticum aestivum L.* сорта Любава (Алимова с соавт., 1993).

Таблица 1 – Штаммы, использованные в работе

Штамм	Объект выделения, описание	Ссылка
<i>Fusarium oxysporum f.sp. radices-cucumerinum (Forc) V03-2g</i>	Патоген огурца, вызывает корневые гнили	Validov et al., 2011
<i>Fusarium oxysporum f.sp. radices-cucumerinum (Forc) SB1</i>	Томаты (Carmello)	Данная работа
<i>Fusarium oxysporum f.sp. radices-cucumerinum (Forc) SB2</i>	Томаты (Carmello)	Данная работа
<i>Fusarium oxysporum f.sp. radices-cucumerinum (Forc) SB3</i>	Томаты (Carmello)	Данная работа
<i>Fusarium oxysporum f.sp. radices-lycopersici (Forl) ZUM2407</i>	Патоген томатов, вызывает корневые гнили	Validov et al., 2011
<i>Bipolaris sorokiniana AB-F 61</i>	Зерна пшеницы сорта Экада 70	Pankova et al., 2018
<i>Alternaria tenuissima AB-F 72</i>	Зерна пшеницы сорта Любава	Pankova et al., 2018
<i>Alternaria arborescens AB-F 73</i>	Зерна пшеницы сорта Любава	Pankova et al., 2018
<i>Alternaria alternata AB-F 74</i>	Зерна пшеницы сорта Маргарита	Pankova et al., 2018
<i>Alternaria alternata AB-F 75</i>	Зерна пшеницы сорта Маргарита	Pankova et al., 2018
<i>Alternaria tenuissima AB-F 76</i>	Зерна пшеницы сорта Эстер	Pankova et al., 2018
<i>Alternaria rosae AB-F 77</i>	Зерна пшеницы сорта Экада 66	Pankova et al., 2018
<i>Alternaria infectoria AB-F 78</i>	Зерна пшеницы сорта Экада 66	Pankova et al., 2018
<i>Alternaria infectoria AB-F 84</i>	Зерна пшеницы сорта Симбирцит	Pankova et al., 2018
<i>Alternaria tenuissima AB-F 85</i>	Зерна пшеницы сорта Симбирцит	Pankova et al., 2018
<i>Fusarium oxysporum SB6</i>	Зерна пшеницы сорта Симбирцит	Pankova et al., 2018
<i>Fusarium solani</i> 6	Картофель	Мухаммадиев с соавт. 2017
<i>Trichoderma asperellum</i> T302	Ископаемые останки. Захороненные почвы	Tukhbatova et al., 2012
<i>Penicillium</i> sp. SB7	Зерна пшеницы сорта Симбирцит	Данная работа
<i>Aspergillus niger</i> SB8	Зерна пшеницы сорта Симбирцит	Данная работа

Выделение патогенных клонов после заражения томатов штаммов *ForcV03-2g*.

Растения с поражениями типичными для корневой гнили томатов извлекали из песка и поверхностно стерилизовали, инкубурируя в растворе 1% раствора гипохлорита натрия с добавлением додецил сульфата натрия (ДСН) до 0,1%, для увеличения смачиваемости. Стерилизующий раствор сливали и к растениям приливали 100 мл стерильной дистиллированной воды, перемешивали и оставляли на 3 – 5 минут. Воду сливали и приливали следующие 100 мл стерильной дистиллированной воды. Таким образом, растения промывали стерильной дистиллированной водой в течение 1 часа до полного удаления гипохлорида натрия (6 – 8 смен воды). После отмычки от стерилизующего раствора места с поражениями вырезали стерильным скальпелем и выкладывали на поверхность агара Чапека для получения мицелия микромицетов, вызвавших поражения на растениях. После 48-120 дней инкубирования при 28 °C мицелий, появившийся на поверхности агара в непосредственной близости от поражения вырезали скальпелем вместе с блоком агара и перекладывали на новую чашку с агаром Чапека. Мицелий, полученный после пересева использовали для получения спор и заражения зерен и проростков томата.

Выделение и очистка ДНК из грибов и растений. Выделение РНК растений и получение кДНК.

Для выделения ДНК биомассу микромицетов выращивали на стерильной фильтровальной бумаге, помещенной на поверхность агризованной среды Чапека. После полного покрытия гифами гриба, фильтровальную бумагу снимали и перемалывали в жидком азоте. Для выделения растительной ДНК, растения извлекали из субстрата и переносили в жидкий азот, где также перемалывали. Перемолотую массу микромицетов или растений переносили в лизирующий раствор и выделяли согласно методике описанной ранее (Validov et al., 2011).

Для выделения РНК растений перемолотую массу смешивали с «Extract RNA» (ООО Евроген., Москва, РФ) и далее выделяли РНК в соответствии с протоколом предоставленным компанией производителем.

Для получения кДНК использовали прямой праймер, предназначенный для ПЦР в режиме реального времени и обратную транскриптазу MMLV (ООО «Евроген», Москва, РФ) в соответствии с рекомендациями производителя. Полученную в результате реакции смесь хранили при -20°C до использования.

BOX- и ERIC-ПЦР анализ штаммов микромицетов

BOX-ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, которая содержит 50 нг геномной ДНК, 2.5 мкл 1х ПЦР-буфера, 2 мкл 10 mM MgCl₂, 0.025 мкл праймера (1000 пмоль, BOXA1R, 5'-СТА CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3') (Louws et al., 1999), 0.5 мкл dNTP (10 mM), и 0.5 мкл Таq ДНК-полимеразы (5U / мкл). ERIC-ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, которая содержит 50 нг очищенной ДНК, 2.5 мкл 1х ПЦР-буфера, 2 мкл 10 mM MgCl₂, 1 мкл каждого праймера (10 пмоль каждого, ERIC 1R, 5'- ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3' и ERIC2, 5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3') (Hulton et al., 1991), 0.5 мкл dNTP (10 mM каждого) и 0.3 мкл Таq ДНК-полимераза (5 U/мкл). Реакционную смесь амплифицировали с помощью амплификатора T100 (Bio-Rad, США) при следующих условиях: начальную стадию денатурации при 95 °C в течение 3 мин с последующим 35 циклами при 95°C в течение 30 сек, 50°C (для обеих BOX- и ERIC-ПЦР) в течение 30 сек и 65°C в течение 8 мин. Затем анализировали в 2.5%

агарозном геле, который окрашивали бромидом этидия и визуализировали в соответствии с системой визуализации (ChemiDoc MP, Bio-Rad, США).

Анализ патогенности изолятов на саженцах пшеницы

Патогенность определяли как степень пролиферации микромицета в растительных тканях, для этого проводили количественную ПЦР (qPCR) на приборе CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, USA) с использованием набора реакционной смеси qPCR mix-HS SYBR (ООО «ЕвроГен», Москва, РФ) с интеркалирующим красителем SYBR Green I. В качестве мишени использовали последовательность гена β -актина.

Анализ патогенности клонов на растениях томатов и огурца

Стерильные проростки томата или огурца инокулировали спорами из каждого из клонов *SB1*, *SB2* и *SB3*, *ForcV03-2g* и *ForlZUM2497*, после чего проростки высаживали в стерильный субстрат. В каждом варианте использовали 50 стерильных проростков. Растения после 14 дней культивирования извлекали из субстрата и выделяли суммарную ДНК. Полученную ДНК использовали для определения интенсивности заражения (т.е. концентрации ДНК грибов на фоне растительной ДНК) с помощью количественной ПЦР с праймерами OMP1049 (5'-TGCGATTGGACGAGATATGTG-3') и OMP1050 (5'-ATTGCCTACCCCTGTACCTACC-3') как это описано (Validov et al., 2011).

Определение экспрессии PR-генов в растениях томата

Стерильные саженцы томатов были инокулированы спорами исходного штамма *Forc V03-2g* и его производными *SB1*, *SB2* *SB3*. Для этого стерильные проростки опускали в ПРР, содержащий споры соответствующих штаммов микромицетов в концентрации 10^3 спор/мл, выдерживали 10 минут и высаживали в стерильный песок, смоченный ПРР. Каждый вариант и контроль, обработанный стерильным ПРР, был заложен в трех повторностях, каждый из которых содержал 10 растений томатов. После инкубации в течении 14 дней при 23°C и длине светового дня 16 часов, растения собирали и перемалывали для выделения суммарной РНК. Экспрессию генов оценивали по количеству копий получаемых РНК. Для этого была проведена обратная транскрипция с праймерами, разработанными для последовательностей PR-генов (Афордоаны и др., 2019). Полученные данные были перенесены из Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad, США) и анализированы с помощью программы MS Exel (Microsoft, США). Сравнение данных было произведено с помощью метода «Double delta Ct» (Livak и Schmittgen, 2001).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Получение клонов *Forc V03-2g*, фитопатогенных по отношению к томатам.

Для получения клонов штамма *Forc V03-2g* с измененной специфичностью к растению-хозяину, стерильные пророщенные семена томатов инокулировали спорами штамма *V03-2g* в высокой концентрации - 10^5 спор/мл. В качестве отрицательного контроля использовали стерильные семена без инокуляции, а в качестве положительного контроля стерильные семена инокулировали штаммом *Forl ZUM2407* также в концентрации 10^5 спор/мл.

Все растения, выращенные в гнотобиотической системе в течение двух недель без инокуляции штаммами *Forc*, были здоровы и при осмотре корней не несли каких-либо поражений. Растения, как до, так и после поверхностной стерилизации не содержали каких-либо эндофитных грибов, способных расти на

среде Чапека, однако при длительном инкубировании появился бактериальный рост (Рисунок 1).

После двух недель роста в гнотбиотической системе все растения томата, инфицированные *Forl* ZUM2407, погибли и несли симптомы фузариозной гнили. Из поражений на растениях в питательном агаре распространялись гифы, со временем образуя воздушный мицелий по морфологии сходный с таковым у штамма *Forl* ZUM2407 (Рисунок 1).

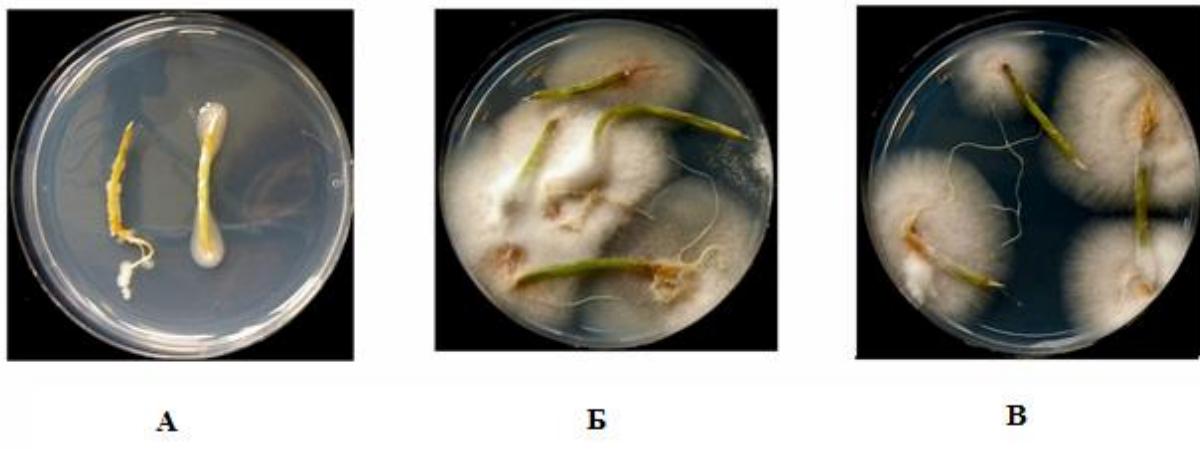


Рисунок 1 – Рост культур *Fox* из поверхностно стерилизованных растений томата на агаре Чапека. А – контроль без инокуляции (виден бактериальный рост), Б – растения томата с пятнами фузариозной гнили после инокуляции *Forl* ZUM2407, В - растения томата с фузариозной гнилью после инокуляции *Forc* V03-2g.

Растения, зараженные спорами штамма *Forc* V03-2g, сохраняли жизнеспособность после двух недель выращивания в гнотбиотической системе. Осмотр выявил 11 растений из 50, с симптомами, характерными для фузариозной гнили. Из этих поражений в агаре Чапека также распространялись гифы, со временем образуя воздушный мицелий по морфологии сходный с таковым штамма *Forc* V03-2g (Рисунок 1). Всего было выделено 11 клонов, которые были обозначены m1, m2, m3, m4, m5, m6, m7, m8, m9, m10 и m11.

3.2 Идентификация клонов *Forc* с помощью ERIC и BOX PCR

Штаммы, выделенные из поражений, потенциально вызванных размножением *Forc* V03-2g, были анализированы с помощью метода ДНК-фингерпринтинга на основе Box- и ERIC-PCR. Мы сравнили эффективность данных методов на наборе мицелиальных грибов разных видов и показали, что с помощью Box- и ERIC-PCR можно различать *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Trichoderma harzianum*, *Fusarium solani* и *Fox*. Более того, чувствительности метода Box- PCR было достаточно для того, чтобы найти различия между отдельными штаммами *Fox* (Рисунок 2).

При сравнении профилей амплифицированных фрагментов, полученных с помощью ERIC-PCR у штаммов V03-2g, *Forl* ZUM2407, а также выделенных клонов m1-m11 никаких различий выявлено не было. При использовании BOX-PCR между штаммами наблюдались различия, причем все штаммы, выделенные из поражений, демонстрировали профили амплифицированных фрагментов, идентичные таковym у штамма V03-2g: мажорная полоса на уровне 500 п.о., слабо выраженные полосы на уровне 1 и 6 т.п.о. (Рисунок 3).

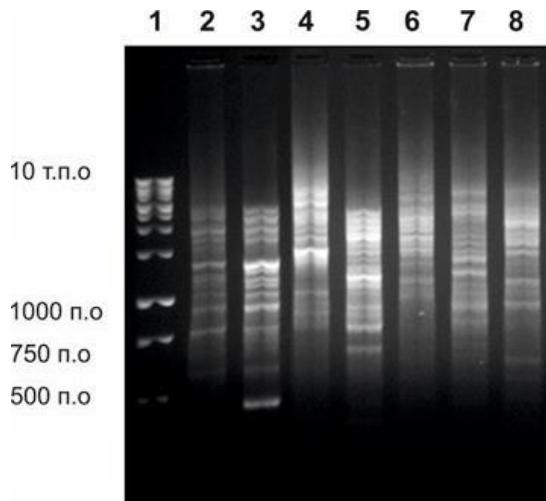


Рисунок 2 – Электрофорез фрагментов ДНК, полученных в ходе амплификации методом Box-PCR. Дорожка 1 – маркеры молекулярной массы ДНК 1kb (ЗАО «Евроген», Москва, РФ). Амплифицированные фрагменты, где в качестве матрицы использовали ДНК штаммов 2 – *Forl ZUM2407*, 3 – *Forc V03-2g*, 4 – *Fox SB6*, 5 – *Fusarium solani* 6, 6 – *Trichoderma harsianum* T302, 7 – *Penicillium sp.SB7*, 8 – *Aspergillus niger* SB8.

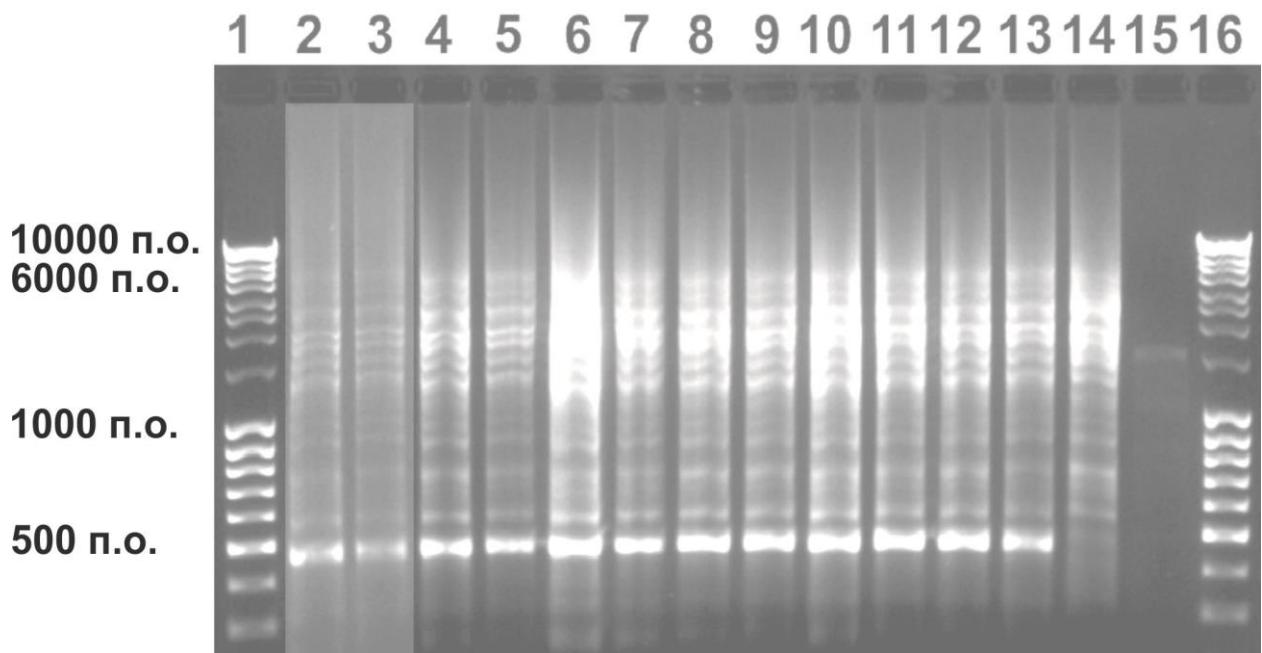


Рисунок 3 – Электрофорез фрагментов ДНК, полученных в ходе амплификации методом Box-PCR. Дорожки 1 и 16 – маркеры молекулярной массы ДНК 1kb (Thermo, Москва, РФ). Амплифицированные фрагменты, где в качестве матрицы использовали ДНК штаммов: дорожка 2 – *Forc V03-2g*, дорожка 3 – m1, 4 – m2, 5 – m3, 6 – m4, 7 – m5, 8 – m6, 9 – m7, 10 – m8, 11 – m9, 12 – m10, 13 – m11, 14 – *Forl ZUM2407*, 15 – контроль без добавления матрицы.

3.3 Тестирование патогенности выделенных производных штамма *Forc V03-2g* на растениях томата

Для определения патогенности выделенные производные штамма *Forc V03-2g* m1 – m11 были тестированы на семенах томата. При этом оценивались два

параметра: влияние на прорастание семян и количество поражений на растениях томата. В качестве контролей использовали исходный штамм *Forc* V03-2g (отрицательный контроль) и *Forl* ZUM2407 (положительный контроль).

Результаты тестирования показали, что по влиянию на прорастание семян только три варианта m2, m5 и m6 статистически значимо отличались от негативного контроля *Forc* V03-2g (Рисунок 4А). При этом у данных штаммов наблюдалось увеличение количества поражений по сравнению с отрицательным контролем, однако эта разница не была статистически значимой (Рисунок 4Б). Все остальные штаммы – производные V03-2g, выделенные из поражений на томатах не отличались ни по влиянию на прорастание семян ни по количеству поражений от исходного штамма (Рисунок 4).

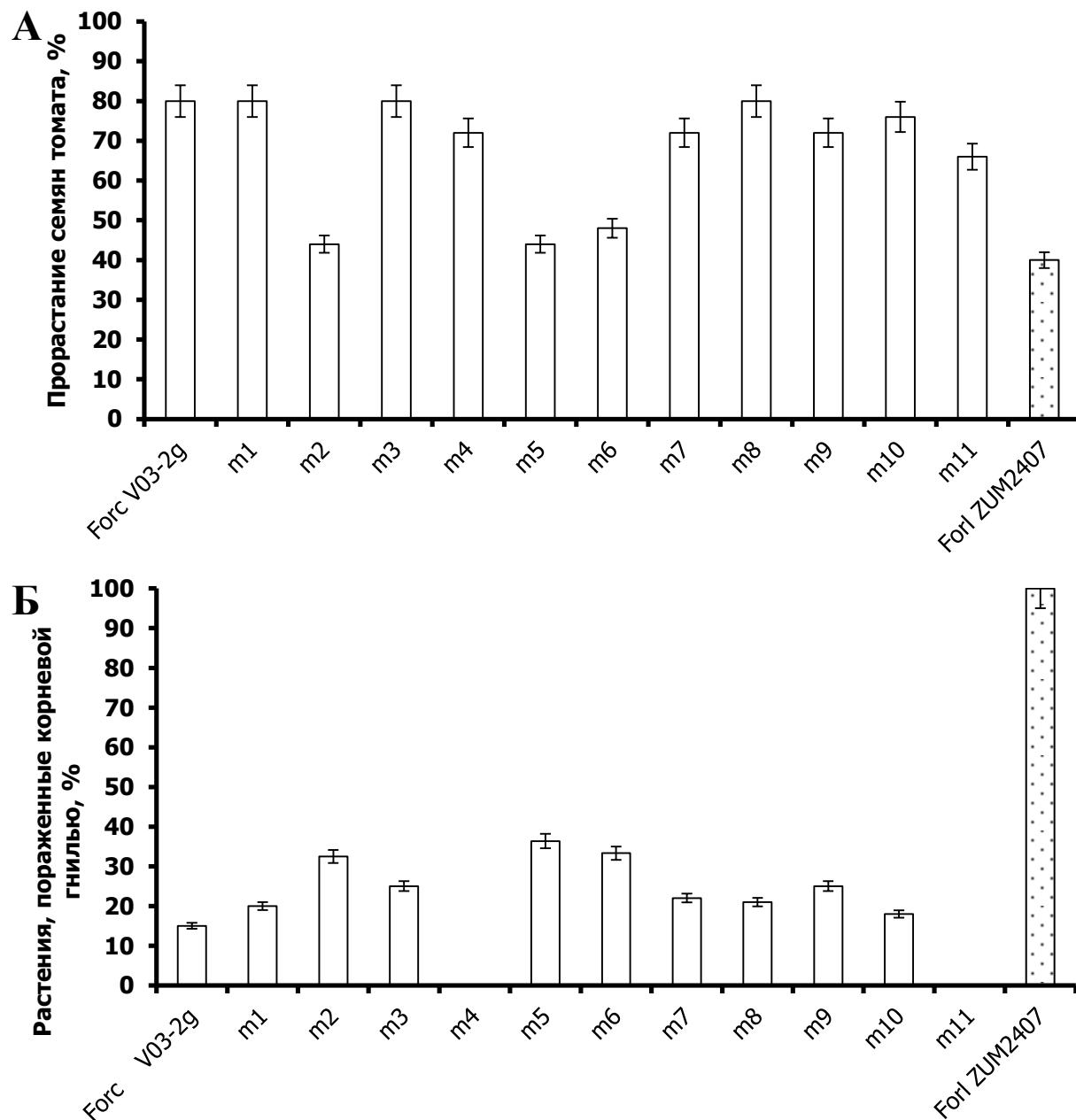


Рисунок 4 – Влияние *Forc* V03-2g, клонов – производных штамма V03-2g и *Forl* ZUM2407: А) на прорастание семян и Б) поражение растений томата.

3.5.1 Получение и тестирование чистых линий штаммов m2, m5 и m6

Для получения чистых культур были использованы споры клонов m2, m5 и m6, которые были высеваны на агар Чапека с разведением 10^{-5} и 10^{-6} достаточным для получения одиночных колоний (Рисунок 5). Мицелий 10 одиночных колоний (линий) был пересеян и использован для получения спор, которые затем были использованы для заражения проростков томата. Линии были обозначены m2.1..m2.10, m5.1..m5.10 и m6.1..m6.10 соответственно. Линии, демонстрирующие стабильное проявление фузариозной гнили на томате, были отобраны из числа чистых линий клонов m2, m5 и m6 и обозначены соответственно как штаммы *Forc* SB1, SB2 и SB3 (Рисунок 6).

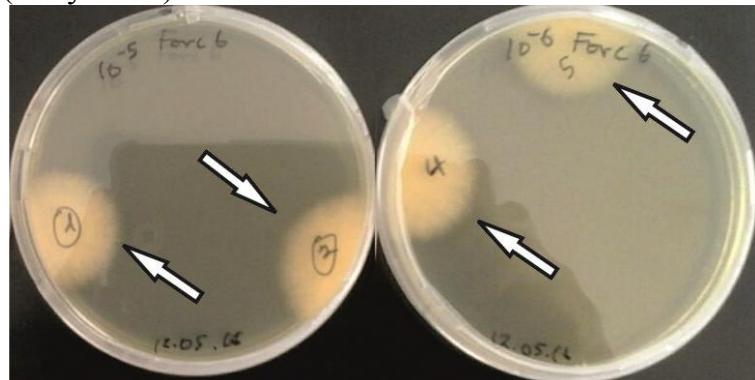


Рисунок 5 – Колонии, полученные из отдельных спор клона m6. Стрелки указывают на отдельные колонии, которые появились от спор.

При этом из десяти анализированных колоний клона m2 была выявлена только одна колония (SB1), заражение спорами которой приводило к значительному развитию фузариозной гнили (Рисунок 6А), однако частота и интенсивность заболевания растений составляла 71%, уступая таковой у *Forl* ZUM2407 (100%).

Среди колоний клона m5 было выявлено три агрессивных, причем интенсивность заболевания растений томата при заражении спорами колонии, позднее обозначенной как штамм SB2, составила 93% пораженных растений, и статистически не отличалась от таковой у томатного патогена *Forl* ZUM2407 (Рисунок 6Б). Среди колоний клона m6 было выявлено две колонии, споры которых вызывали поражение на 75% и 73% растений томатов соответственно.

3.5.2 Оценка фитопатогенных свойств штаммов *Forc* SB1, SB2 и SB3

Для оценки фитопатогенных свойств, штаммы SB1, SB2 и SB3 были тестированы на новом растении-хозяине – томатах. При этом состояние растений оценивали визуально путем подсчета поражений. Результаты показывают, что при заражении растений томата штаммы SB1, SB2 и SB3 вызывают больше поражений, чем исходный штамм *Forc* V03-2g и эта разница статистически достоверна (рисунок 7).

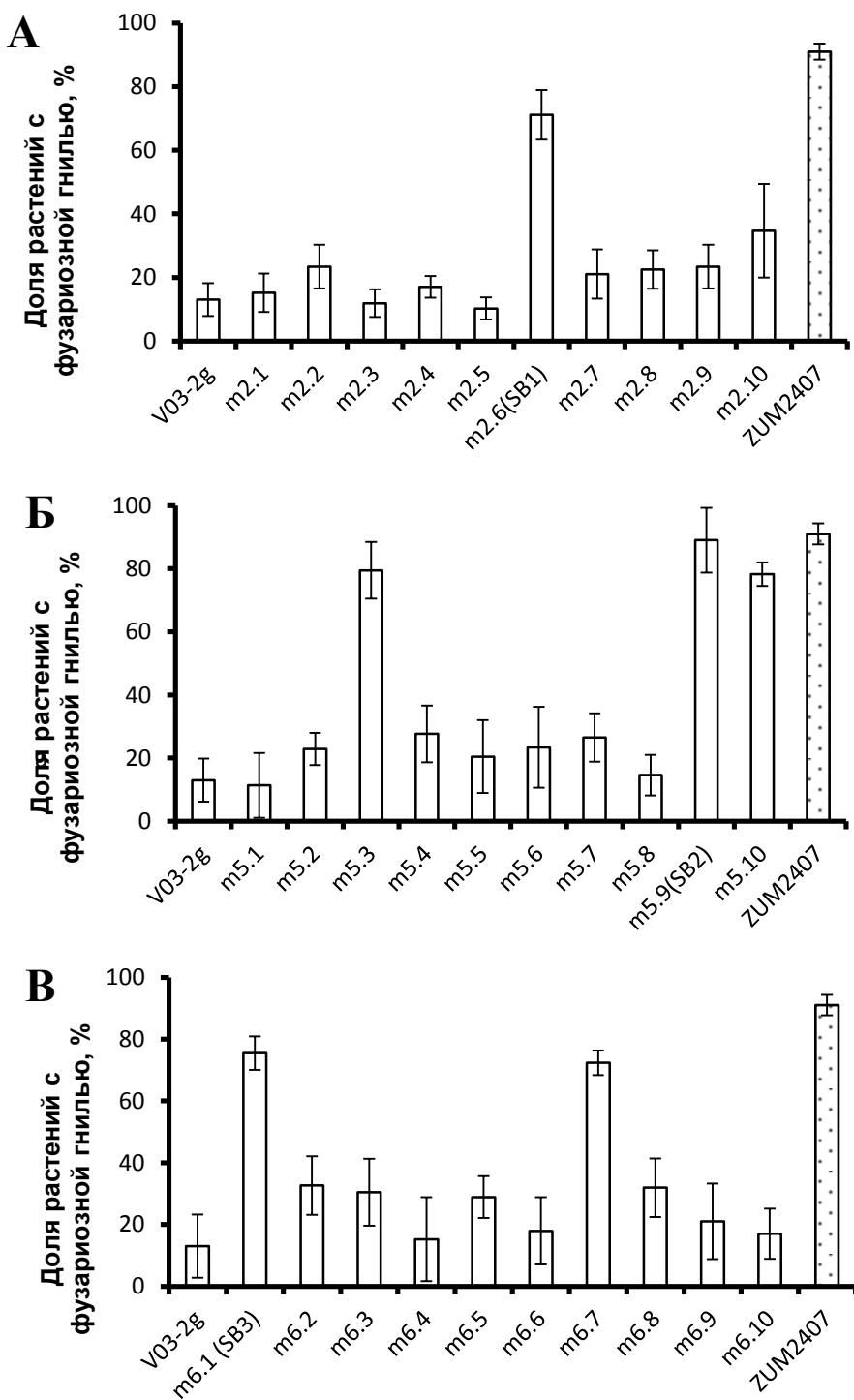


Рисунок 6 – Анализ агрессивности клонов, полученных из одиночных колоний клонов (А) m2, (Б) m5 и (В) m6. В качестве отрицательного контроля использовали штамм *Forc* V03-2g и *Forl* ZUM2407 использовался в качестве положительного контроля.

Штамм *SB1* значительно уступал в количестве поражений томатному патогену *Forl* ZUM2407. Штамм *SB3* статистически не отличался от ZUM2407 по уровню поражения томатов. При этом штамм *SB2* показывает более высокий уровень поражения растений (0.96), чем модельный томатный патоген *Forl* ZUM2407 (0.65).

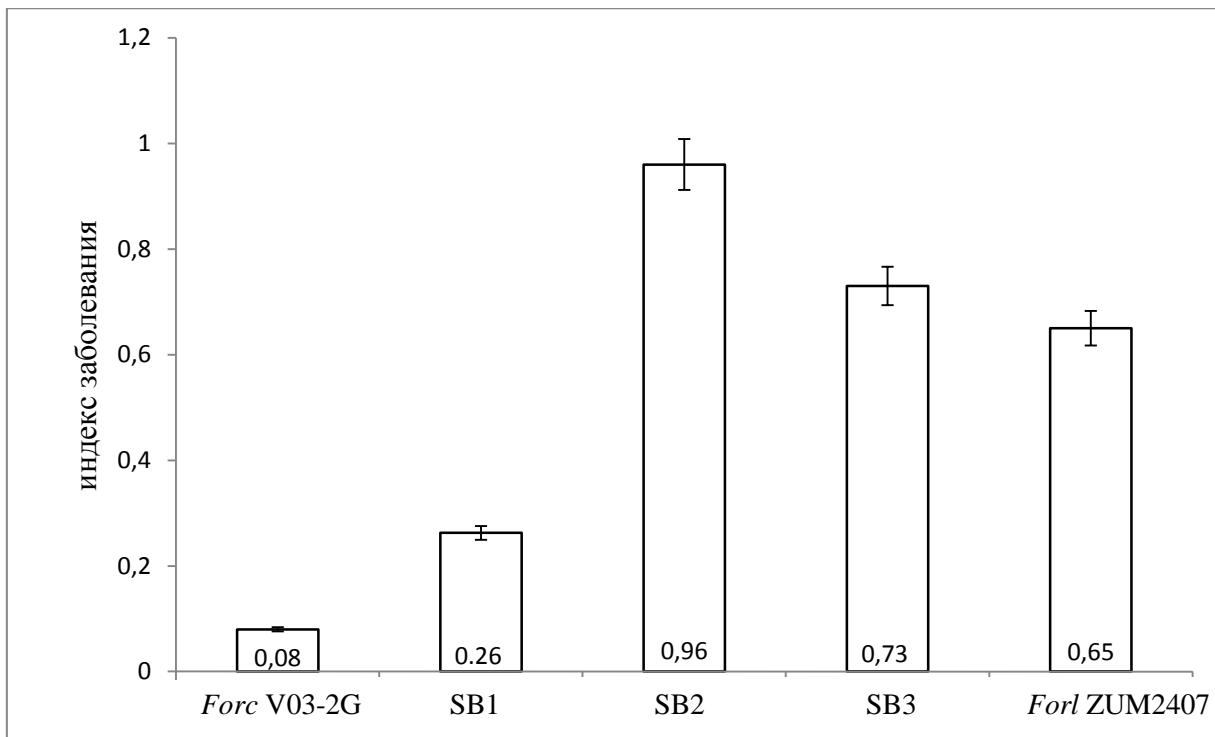


Рисунок 7 – Результаты визуального определения интенсивности заболевания растений. Индекс заболевания (ИД) оценивали по формуле: ИД = $(n_0 \times 0 + n_1 \times 1 + n_2 \times 2 + n_3 \times 3 + n_4 \times 4) / (n_0 + n_1 + n_2 + n_3 + n_4)$, в которой n_0 , n_1 , n_2 , n_3 и n_4 - число растений с индексами 0, 1, 2, 3 и 4 соответственно.

Исследование поражений с помощью световой микроскопии

Поражения исследовали с помощью световой микроскопии. При исследовании растений с поражениями были выявлены потемнения, которые являются гифами микромицетов, проникших в ткани томатов. Было показано, что поражения, вызванные томатным патогеном *Forl ZUM 2407* и штаммами-производными *Forc V03-2g* сходны по морфологии, но отличаются по интенсивности колонизации гифами и оттенком окружающих тканей растений (Рисунок 8).

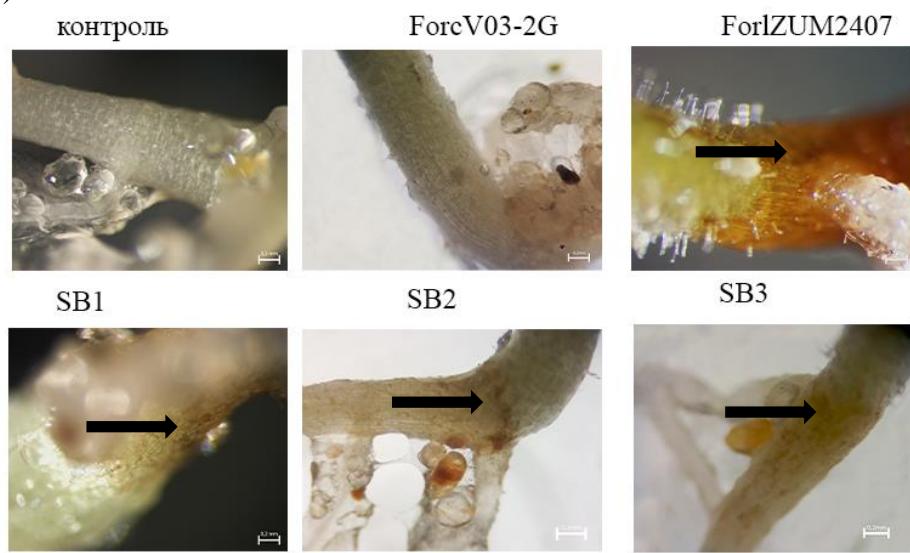


Рисунок 8 – Исследование морфологии поражений, которые оказывают штаммы SB1, SB2, SB3 и *Forc V03-2g*, *Forl ZUM 2407* с помощью световой микроскопии. Стрелками указаны поражения

Оценка патогенности производных штамма *Forc V03-2g* с помощью количественного ПЦР.

Патогенность штаммов также была оценена с помощью количественного ПЦР (qPCR). Ранее этот подход был эффективно использован для анализа поведения фитопатогенного, несовместимого фитопатогена и сапрофитного штаммов *Fox* на томатах (Validov *et al.* 2011). Помимо видимых поражений растений, результаты количественного ПЦР показали, что штаммы SB1, SB2 и SB3 присутствуют в тканях томатов в количествах больших, чем исходный штамм *Forc V03-2g* (Рисунок 9).

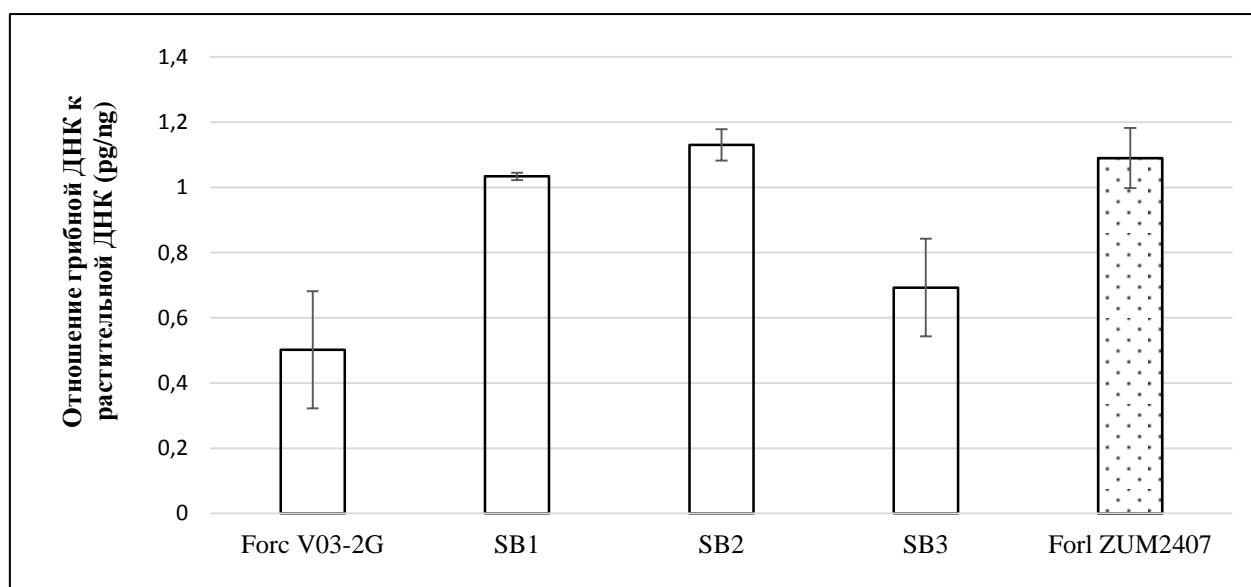


Рисунок 9 – Определение количества ДНК фитопатогенных микромицетов в суммарной ДНК растений томата.

Все три производных штамма *Forc V03-2g* – SB1, SB2 и SB3 поражали растения огурца. При этом штамм SB2 был агрессивней исходного штамма *Forc V03-2g* (Рисунок 10).

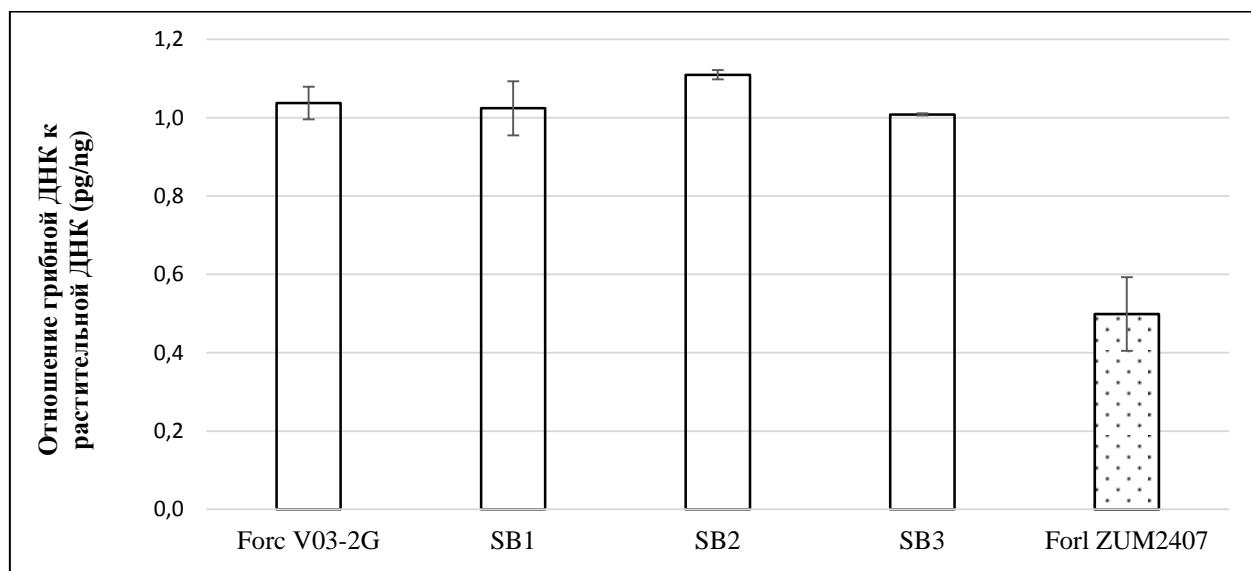


Рисунок 10 – Определение количества ДНК фитопатогенных микромицетов в суммарной ДНК растений огурца.

При этом SB2 демонстрировал более интенсивное размножение в тканях томатов, чем томатный патоген – *Forl* ZUM2407. По интенсивности заражения SB3 значительно уступал *Forl* ZUM2407 и статистически не отличался от исходного штамма *Forc* V03-2g.

Томатный патоген *Forl* ZUM2407 значительно уступал всем остальным штаммам по количеству биомассы в тканях растений огурца (Рисунок 9). Результаты эксперимента показывают, что производные штамма *Forc* V03-2g – SB1, SB2 и SB3 сохранили способность к заражению растений огурца, однако приобрели также способность к паразитированию на растениях томата.

Определение фитопатогенности изолятов на растениях пшеницы

Поскольку штаммы SB1, SB2 и SB3 показывали повышение агрессивности на исходном хозяине, мы проверили фитопатогенные свойства исходных и выделенных штаммов по отношению к пшенице, как к третьему виду растений, которое одинаково филогенетически отдалено как от представителей семейства тыквенных так и от представителей семейства пасленовых. Присутствие ДНК микромицетов было показано во всех анализированных пробах. В контрольном образце были выявлены минимальные количества грибной ДНК (0.56-копий гена *act/ng*). Выделенные микромицеты отличались по агрессивности по отношению к пшенице и использовались в данном эксперименте как положительный и отрицательный контроль (Таблица 2).

Проведя однофакторный дисперсионный анализ сравниваемых образцов, было рассчитано р-значение, равное 0.403×10^{-12} , что говорит о том, что среднее количество копий гена актина статистически значимо различается в зависимости от вида микромицета, развивающегося на проростках пшеницы.

Результаты показывают, что штаммы *Forl* ZUM2407, *Forc* V03-2g и его производные штаммы SB1, SB2 и SB3 не патогенны для пшеницы.

Таблица 2 – Результаты количественной ПЦР. Для перечисленных микромицетов показано количество копий актина грибов в тотальном препарате ДНК, выделенном из растений пшеницы.

Анализируемые образцы микромицетов	Число копий гена β-актина / ng экстрагированной ДНК
Контроль ПРР	0.56 ± 0.20
<i>Forl</i> ZUM2407	0.67 ± 0.53
<i>Forc</i> V03-2g	0.73 ± 0.11
<i>Forc</i> SB1	0.78 ± 0.24
<i>Forc</i> SB2	0.69 ± 0.37
<i>Forc</i> SB3	0.59 ± 0.56
<i>B. sorokiniana</i> AB-F 61	4.75 ± 1.77
<i>A. tenuissima</i> AB-F 72	9.34 ± 3.33
<i>A. arborescens</i> AB-F 73	2.91 ± 0.69
<i>A. alternata</i> AB-F 74	5.39 ± 1.12
<i>A. alternata</i> AB-F 75	5.98 ± 1.81
<i>A. tenuissima</i> AB-F 76	14.29 ± 3.61
<i>A. rosae</i> AB-F 77	14.99 ± 4.27
<i>A. infectoria</i> AB-F 78	12.46 ± 4.71
<i>A. infectoria</i> AB-F 84	12.41 ± 3.78
<i>A. tenuissima</i> AB-F 85	13.05 ± 2.65

3.6 Изменения в транспозонах класса II в штаммах, *Forc V03-2g*, *Forl ZUM 2407*

Для выявления изменений в геноме штаммов в нашем исследовании мы использовали метод qPCR для анализа изменений транспозибельных элементов II класса *Hornet1*, *Hornet2*, *Hornet3*, *mimp1*, *mimp2*, *Fot3*, *Fot4*, *Han* и *marsu* (Hua-Van *et al.*, 2000) в вариантах штамма V03-2g, которые приобрели патогенность по отношению к томатам, по сравнению с исходным штаммом, а также для оценки представленности транспозибельных элементов у фитопатогенного штамма *Forl ZUM2407*, вызывающего корневые гнили у томатов.

При сравнении исходного варианта штамма, обозначенного *M-Forc V03-2g*, который хранился в виде замороженной культуры при -80°C и варианта штамма (далее *Forc V03-2g*), который поддерживался в течение одного года в виде пассажей на агаризованной среде Чапека было показано, что копийность всех исследованных транспозонов в 4.1 – 8.5 раз выше у последнего (Рисунок 10), что может свидетельствовать о размножении транспозибельных элементов при постоянных пассажах штамма на лабораторных средах.

При количественном сравнении транспозонов в исходном штамме *Forc V03-2g* и его производных штаммах с расширенным кругом хозяев *Forc SB1* и *SB2* наблюдалось статистически достоверное снижение копийности транспозонов *mimp1*, *mimp2*, *Han* и *marsu* более чем в два раза. Кроме того, у штамма *SB2* снизилось количество *Hornet1*. У штамма *SB3* показано увеличение копийности транспозона *Hornet2*, копийность остальных транспозибельных элементов достоверно не отличалась от таковой у исходного штамма (рисунок 10)

При сравнении транспозибельных элементов в штаммах *ZUM2407* и исходного *M-Forc V03-2g* было показано, что копийность транспозонов *Fot4*, *mimp1* и *Han* в 3, 11 и 13 раз выше, соответственно, тогда как копийность *Hornet1* была выше у штамма *ZUM2407*. Копийность всех транспозибельных элементов была выше у *Forc V03-2g*, в более чем 80 раз превышает таковую у штамма *ZUM2407* для *mimp1* и *Han*. (рисунок 10).

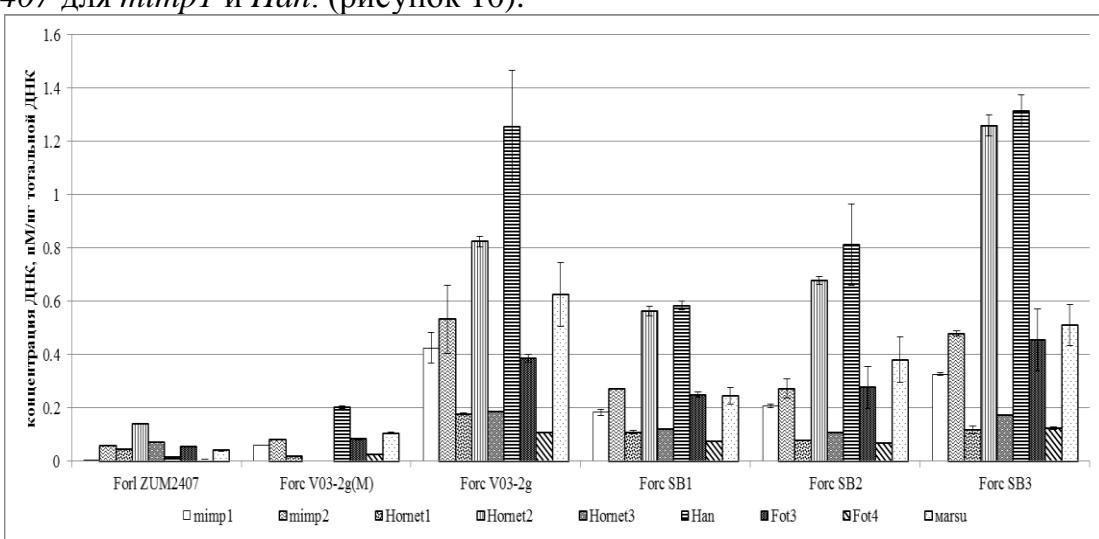


Рисунок 10 – Определение содержания транспозонов II класса в штаммах *Fusarium oxysporum* с помощью количественного ПЦР.

3.7 Реакция растений томата на заражение штаммами *Foc*: экспрессия PR-генов.

Для определения влияния исходного штамма V02-3g и клонов с расширенной фитопатогенностью на растения было проведено количественное определение транскрипции генов SAAP1, PR10, CE120chr6, Chi3, Chi9 и GEBGA у инфицированных томатов. В качестве референсного гена был использован ген актина *act*, который согласно данным литературы экспрессируется конститутивно. В результате экспериментов было показано, что при равных количествах, транскрибуемых РНК актина, экспрессия генов SAAP1, PR10, Chi3, и GEBGA в растениях томатов при заражении штаммами SB1, SB2 и SB3 увеличивается (Рисунок 19). Экспрессия генов CE120chr6 и Chi9 при заражении томатов штаммом SB2 не отличалась от таковой, при заражении исходным штаммом, однако при заражении штаммами SB1 и SB3 экспрессия этих генов также усиливалась (Рисунок 11). Изменения в экспрессии PR-генов указывают на то, что растение реагирует на штаммы с расширенной патогенностью как на атаку некротизирующим патогеном.

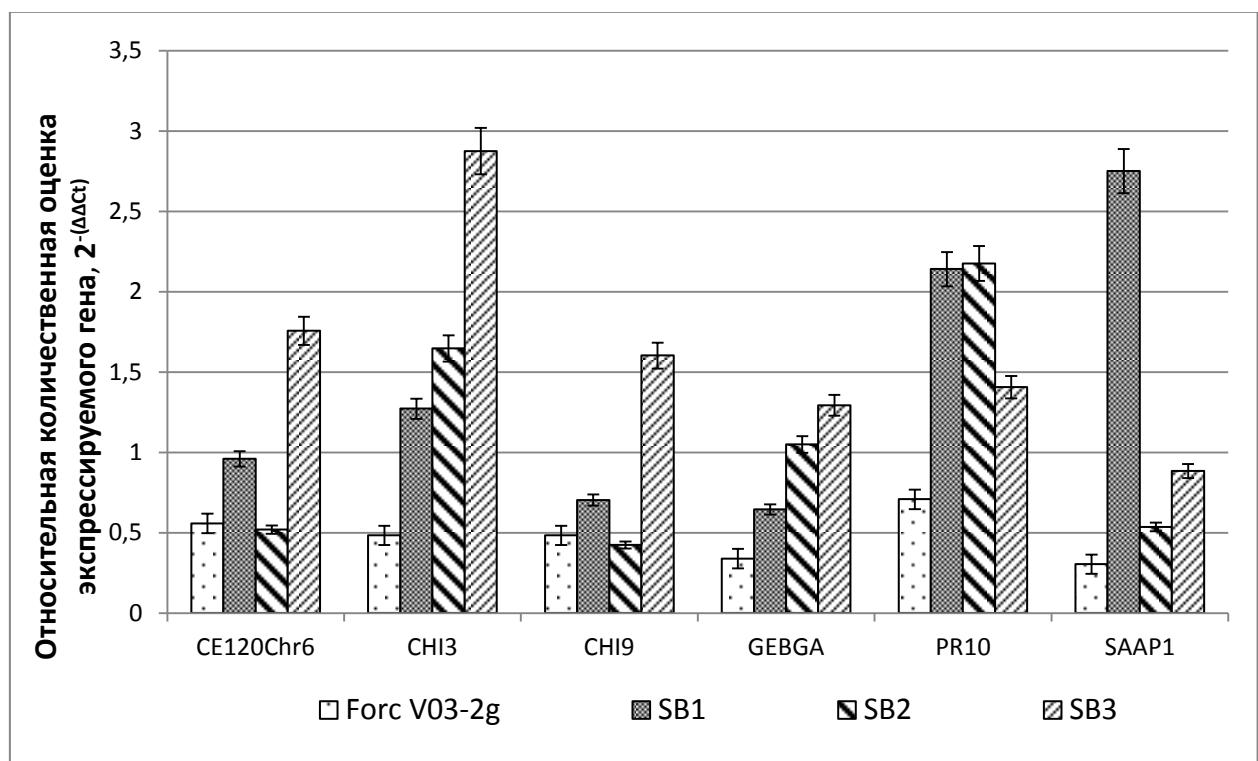


Рисунок 11 – Экспрессия PR-генов в растениях томата, зараженных несовместимым патогеном *Forc* V03-2g и его производными *SB1*, *SB2* и *SB3*, фитопатогенными для растений томата. Данные нормализованы в соответствии со значениями уровней экспрессии гена актина.

Для томатов было показано, что ряд генов усиленно транскрибируется при поражении растения, причем транскрипция отдельных генов может повышаться значительно. Экспрессия всех тестированных генов SAAP1, PR10, CE120chr6, Chi3, Chi9 и GEBGA была выше в томатах, зараженных штаммами SB1, SB2 или SB3, чем в растениях инокулированных исходным штаммом *Forc* V03-2g. Хотя штамм SB2 также вызывал появление поражений на томатах, однако экспрессия генов

CE120chr6 и Chi9 в томатах, зараженных этим штаммом не отличалась от таковой томатов, инокулированных штаммом *Forc* V03-2g (см. Рисунок 11).

ВЫВОДЫ

1. Из гетерогенной популяции огуречного патогена *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* V03-2g выделены клоны, способные ингибировать прорастание семян и вызывать поражение растений томатов, индуцируя развитие корневой гнили томатов.

2. Выявлены наиболее агрессивные клоны штамма *Forc* V03-2g (*SB1*, *SB2* и *SB3*); установлена их патогенность по отношению к растениям огурца и томатов, что свидетельствует об изменении фитопатогенных свойств *Fusarium oxysporum* путем расширения специфичности к растениям-хозяевам.

3. Показано, что содержание транспозонов второго класса в клонах *Forc* V03-2g с измененной специфичностью к растению-хозяину может отличаться от такового у исходного штамма, причем такие изменения могут происходить за сравнительно короткое (порядка 3-х недель) время.

4. Экспрессия PR-генов в растениях томатов, зараженных штаммами *Forc* V03-2g *SB1*, *SB2* и *SB3* выше, чем в растениях, инокулированных исходным огуречным патогеном *Forc* V03-2g, что свидетельствует о реакции томатов на эти штаммы как на фитопатогены.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Афордоаны Д.М. Экспрессия генов патогенеза в томатах, инфицированных штаммами *Fusarium oxysporum*, различающихся по вирулентности /Афордоаны Д.М., Имангулова С.А., Валидов Ш.З.// Международный научный журнал «Научные вести» – 2019. – № 6(11). – Р 117-125.
2. Афордоаны Д.М. Изменения в количестве транспозонов II класса у штамма *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* V03-2g и его производных мутантах с расширенной фитопатогенностью. / Афордоаны Д.М., Тоасенитч А., Валидов Ш.З. // Ученые Записки Казанского Университета. Серия Естественные Науки. – 2019. – Т. 161, кн.1. – С. 66-76.
3. Pankova A.V. Identification of Phytotoxic and Phytopathogenic Fungi on Grains and Wheat Seedlings / A.V. Pankova, D.M. Afordoanyi, A.R. Valiev, L.R. Valiullin, R.I. Safin, R.M. Nizamov, S.Z. Validov // Advances in Engineering Research. – 2018. – V. 151. – P 759-765.
4. Афордоаны, Д. М. Изменение хост-специфичности фитопатогенного штамма *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* V03-2g / Д.М. Афордоаны // Конференция «Ломоносов 2017». Международный молодёжный научный форум: материалы Международной науч. конф., 10-14 апреля 2017 г. Москва.

УЧАСТИЕ В НАУЧНЫХ КОНФЕРЕНЦИЯХ

Материалы диссертации представлены на международных и всероссийских конгрессах и конференциях: Международный молодёжный научный форум, Ломоносов (Москва, 2017 г.); конференция INTERACTION: FROM CELL TO HUMAN, Russian-German Seminar dedicated to 30th anniversary of partnership between Justus Liebig University Giessen and Kazan (Volga Region) Federal University Kazan, May 20-24, 2019.